棉铃虫可溶型海藻糖酶的化学修饰

艾 东[1]，林荣华[2]，王 猛[3]，梁晓贺[1]，于彩虹[1,*]

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院，北京 100091；2. 农业部农药检定所，北京 100125；
3. 龙口市出入检验检疫局，山东龙口 265700)

摘要：【目的】本研究旨在通过分析化学修饰剂对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 可溶型海藻糖酶活性的影响，以明确海藻糖酶活性中心的结构特点和氨基酸构成。【方法】采用化学修饰方法，测定不同修饰剂处理后棉铃虫 5 龄幼虫海藻糖酶催化活性的变化，进而通过化学修饰反应失活常数来推测酶活性中心的特定氨基酸残基数量。【结果】采用 8 mmol/L 水溶性碳二亚胺(carbodiimide, EDC)溶液和 25 mmol/L 苯甲酰甲醛(phenylglyoxal, PG)溶液分别对棉铃虫 5 龄幼虫海藻糖酶羧酸基团和精氨酸残基进行修饰后，其活性分别减少 81.58% 和 54.14%，这表明对羧酸基团和精氨酸残基的修饰可有效抑制海藻糖酶活性。底物海藻糖可保护海藻糖酶不受修饰剂的影响。修饰动力学结果显示，海藻糖酶活性中心可能包含 1 个羧酸基团和 2 个精氨酸残基。【结论】结果表明，含有羧基的谷氨酸和天冬氨酸是海藻糖酶活性中心的催化残基，精氨酸是维持海藻糖酶活性的必要残基。本研究结果可为开发新型农药提供理论支持。

关键词：棉铃虫；海藻糖酶；化学修饰；活性中心；失活常数

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2018)07-0801-07

Chemical modification of soluble trehalase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuiadae)

AI Dong[1], LIN Rong-Hua[2], WANG Meng[3], LIANG Xiao-He[1], YU Cai-Hong[1,*] (1. School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining & Technology, Beijing 100091, China; 2. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China; 3. Longkou Entry-exit inspection and Quarantine Bureau, Longkou, Shandong 265700, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to explore the composition of amino acid residues in the active site of soluble trehalase from *Helicoverpa armigera* by analyzing the effect of chemical modification on this enzyme activity.【Methods】Chemical modification method was used to investigate the effect of chemical modifier on the soluble trehalase activity in the 5th instar larvae of *H. armigera*. The number of amino acid residues in active center was obtained from the deactivation rate constant of the modification reaction.【Results】The soluble trehalase activity in the 5th instar larvae of *H. armigera* was reduced by 81.58% and 54.14% after chemical modification by 8 mmol/L carbodiimide (EDC) and 25 mmol/L phenylglyoxal (PG), respectively, indicating that the modification of carboxylic acid group and arginine residues can inhibit the soluble trehalase activity effectively. The treatment with the substrate trehalose prevented the loss of enzyme activity from the chemical modification. Kinetic studies on chemical modification showed that the active site of soluble trehalase includes one carboxylic acid group and two arginine residues.【Conclusion】These results indicate that two carboxylic amino acids, *i.e.*, glutamic

基金项目：国家自然科学基金项目(31171912, 30671393)

作者简介：艾东，男，1990 年 10 月生，辽宁沈阳人，博士研究生，研究方向为生物化学与分子生物学，E-mail：as26@foxmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: caihongyu2013@126.com

收稿日期 Received: 2018-01-16；接受日期 Accepted: 2018-04-25

acid and aspartic acid, are the vital residues of the active site of the soluble trehalase, and arginine is essential for the trehalase activity. These results provide theoretical support for the development of new pesticides.

Key words: *Helicoverpa armigera*; trehalase; chemical modification; active site; deactivation rate constant

海藻糖酶(EC 3.2.1.28)是一种典型的端基反相异构 α-糖苷水解酶,属葡萄糖苷水解酶,可特异性地将一分子海藻糖水解为各一分子的 α-葡萄糖和 β-葡萄糖 (Lee *et al*., 2007)。海藻糖酶对昆虫生长代谢和抗逆性等具有重要作用,如不仅可调控昆虫能量代谢和几丁质合成(Jie *et al*., 2010; Zou *et al*., 2013),还能影响昆虫的滞育(Yang *et al*., 2013)。

昆虫海藻糖酶分为可溶性和膜结合型两类,但酶活性多以可溶性海藻糖酶为主(Tan *et al*., 2014)。由于哺乳动物体内缺乏海藻糖,因此以海藻糖酶作为杀虫剂的靶标具有对人畜安全的选择毒性(于彩虹等, 2011)。目前有关海藻糖酶晶体结构的研究较少,尚不能基于酶结构及其有效基团进行药物的筛选和改进。为阐明海藻糖酶对底物的作用机制,通常可采用化学修饰法进行研究。其中,化学修饰剂主要作用于氨基酸侧链外部的功能基团,而这些基团通常位于酶的功能位点,对保持酶活性具有重要作用。不同化学修饰剂作用于不同氨基酸的极性侧链基团,如羟基、巯基、氨基、咪唑基、胍基和羧基等。例如,焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DPC)作用于组氨酸咪唑基,使其氮羧乙基化(Dill and Shortle, 1991);碳二亚胺(carbodiimide, EDC)特异性修饰谷氨酸和天冬氨酸的羧酸基团;苯甲酰甲醛(phenylglyoxal, PG)与精氨酸的胍基生成稳定的杂环化合物;四硝基甲烷(tetranitromethane, TNM)与酪氨酸的酚基反应生成3-硝基酪氨酸衍生物(Enoch and Strittmatter, 1978);三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfolnic acid, TNBS)对赖氨酸 ε-氨基进行修饰。通过化学修饰法分析,可以获悉酶分子活性部位的必需氨基酸残基的种类、数目和性质等,进而可探究酶蛋白的分子空间结构、活性部位构象、催化机理以及功能等(Wang *et al*., 1996)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是世界范围内的主要害虫之一,危害棉花、大豆 *Glycine max*、高粱 *Sorghum bicolor*、向日葵 *Helianthus annuus* 等多种农作物和园艺植物。本研究以棉铃虫可溶性海藻糖酶为研究对象,分别采用5种专一性化学修饰剂,通过化学修饰、底物保护和修饰动力学等方法对海藻糖酶活性位点的氨基酸残基种类和数量进行研究,获得的结果有助于明确海藻糖酶功能位点的氨基酸组成特征,为进一步开发环境友好型农药提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

棉铃虫5龄幼虫取自农业部农药检定所环境室,饲养温度25~28℃,相对湿度50%~70%,光周期14L:10D。

棉铃虫可溶性海藻糖酶由本实验室分离、纯化(于彩虹等, 2016),纯化倍数23.84,酶比活力2.022 U/mg;焦炭酸二乙酯(DPC)、水溶性碳二亚胺(EDC)、苯甲酰甲醛(PG)、四硝基甲烷(TNM)和三硝基苯磺酸(TNBS)等购自 Sigma-Aldrich 公司;葡萄糖氧化酶试剂盒购自北京利德曼生化股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 酶活力的测定

海藻糖酶活性测定参照 Silva 等(2006)方法并加以改进(于彩虹等, 2016)。酶活力单位(U)定义为:在最适条件下每分钟将1 μmol底物转化为产物所需要的酶量。

1.3 棉铃虫可溶性海藻糖酶的化学修饰

5种化学修饰剂的反应条件如表1所示。反应体积为200 μL,取相应的缓冲液将不同蛋白修饰剂配制成100 μL不同浓度溶液,与等体积纯化的海藻糖酶溶液混匀,30℃反应不同时间后立即加入100 μL失活剂,30℃保温15 min,然后加入300 μL 7 mmol/L海藻糖溶液,30℃作用15 min,沸水浴5 min。此后按1.2节方法测定海藻糖酶活性。对照组使用缓冲液代替修饰剂,每组实验各重复3次。

1.3.1 羧基和精氨酸残基数的测定:在 EDC 终浓度为4.0, 6.0, 8.0 和12.0 mmol/L 条件下,分别测定不同反应时间(0, 10, 20, 40, 60, 80 和100 min)后的酶活力。将酶活力换算成自然对数后按时间作图,以反应方程 $\ln([E]_t/[E]_0) = -Kobs \times t$ 计算一级失活常数(*Kobs*),其中,$[E]_t$ 和 $[E]_0$ 分别

表 1　棉铃虫可溶性海藻糖酶化学修饰反应条件

Table 1　Experimental condition for the chemical modification of the soluble trehalse from *Helicoverpa armigera*

化学修饰剂 Chemical modifier	缓冲液 Buffer solution	失活剂 Deactivator
三硝基苯磺酸 Trinitrobenzene sulfolnic acid (TNBS)	50 mmol/L Na_3PO_4, pH 7.0	1 mmol/L NaH_2PO_4, 15 μmol/L Na_2SO_3
焦炭酸二乙酯 Diethyl pyrocarbonate (DPC)	100 mmolL TEMED, pH 6.0	60 μmol/L His
碳二亚胺 Carbodiimide (EDC)	100 mmolL TEMED, pH 6.0	10 mmol/L CH_3COONa
苯甲酰甲醛 Phenylglyoxal (PG)	100 mmolL MOPS, pH 8.0	10 mmol/L CH_3COONa
四硝基甲烷 Tetranitromethane (TNM)	50 mm/L HEPES, pH 8.5	10 mmol/L CH_3COONa

为海藻糖酶在反应 t 时刻和 0 时刻的剩余活力。取不同修饰剂浓度 [I] 下的一级失活常数按 Hollenberg 公式：$\lg Kobs = n\lg[I] + \lg k1$，以 $\lg[I]$ 为横坐标，$\lg Kobs$ 为纵坐标作图，横轴截距为二级失活常数($k1$)的常用对数，直线斜率 n 为失活反应级数，即每个海藻糖酶分子中羧基结合修饰剂的表观分子数。

在 PG 终浓度分别为 1.625, 3.25, 7.5, 12.5, 15 和 25 mmol/L 条件下，按上述方法测定海藻糖酶中的精氨酸残基数。

1.3.2　底物对海藻糖酶化学修饰的保护作用：将 6.0 mmol/L EDC 溶液、纯化的海藻糖酶溶液和 7 mmol/L 海藻糖溶液各 100 μL 混匀（此时体系中的 EDC 终浓度为 2.0 mmol/L，海藻糖终浓度为 2.33 mmol/L），30℃分别反应 0, 10, 20, 40, 60, 80 和 100 min，加入 100 μL 10 mmol/L 醋酸钠溶液，混匀后静置 30 min；再加入 300 μL 7 mmol/L 海藻糖溶液，30℃反应 15 min，沸水浴 5 min。此后，按 1.2 节方法测定海藻糖酶活性。对照组使用缓冲液代替修饰剂，每组实验各重复 3 次。

2　结果

2.1　EDC 处理对棉铃虫 5 龄幼虫中肠海藻糖酶活性的影响

由图 1 可知，EDC 处理可明显降低棉铃虫 5 龄幼虫中肠海藻糖酶活性。当 EDC 终浓度为 1 mmol/L 时，反应 100 min 后的酶活性剩余 53.41%；当 EDC 终浓度上升至 10 mmol/L 时，反应 100 min 后的酶活性仅剩余 11.94%。这表明海藻糖酶活性随 EDC 浓度升高以及反应时间延长而明显下降。由此推测羧基位于棉铃虫可溶性海藻糖酶的活性中心，对保持酶活性具有重要作用。

由图 2 可知，不同浓度 EDC 作用下剩余酶活力的自然对数与时间呈线性相关。这表明海藻糖酶的失活反应是按一级反应进行。根据一级失活反应方程，得到 4.0, 6.0, 8.0 和 12.0 mmol/L EDC 作用浓度下的一级失活速度常数（$Kobs$）分别为 0.079, 0.0144, 0.0187 和 0.0274/min。

采用 Hollenberg 作图法，以 $\lg Kobs$ 对 $\log[I]$ 作

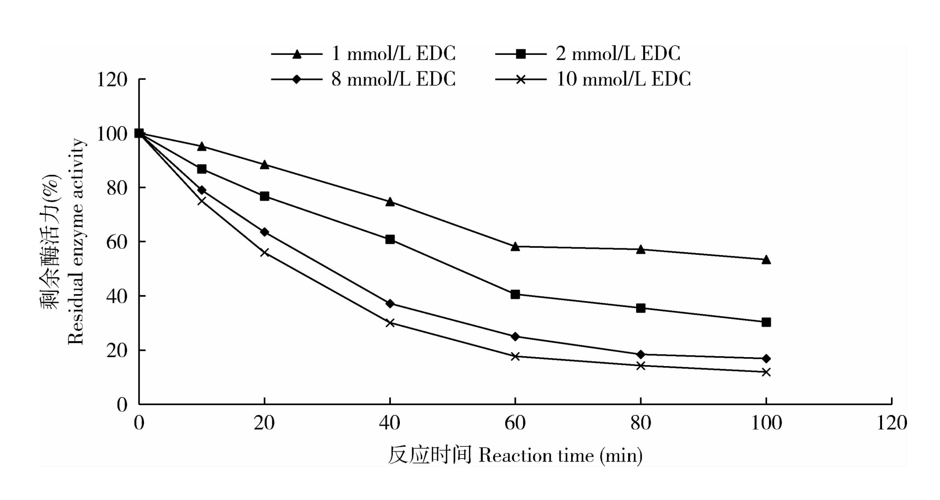


图 1　EDC 对棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性的影响

Fig. 1　Effect of EDC on the soluble trehalse activity in the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

图。如图 3 所示,所得直线斜率为 0.71,即 $n=1$。这表明每个海藻糖酶分子仅结合 1 个 EDC 分子后就导致酶活力的完全丧失,即每个海藻糖酶分子中仅有 1 个羧基是维持酶活性所必需的。

如图 4 所示,7 mmol/L 海藻糖可以完全保护海藻糖酶不被化学修饰剂 EDC 所修饰。这进一步证明羧基处于海藻糖酶的活性位点,并参与和底物海藻糖的结合。

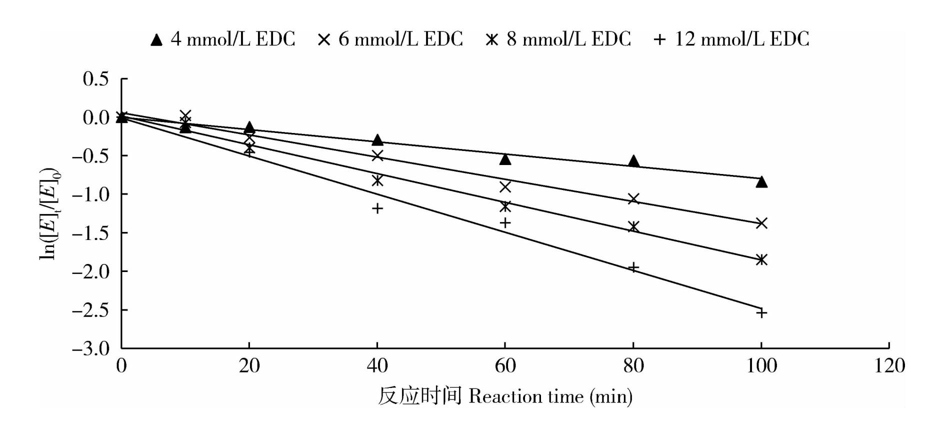


图 2 EDC 对棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性位点的伪一级失活反应

Fig. 2 Pseudo-first-order plots for the inactivation of the soluble trehalse active site from the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* by EDC

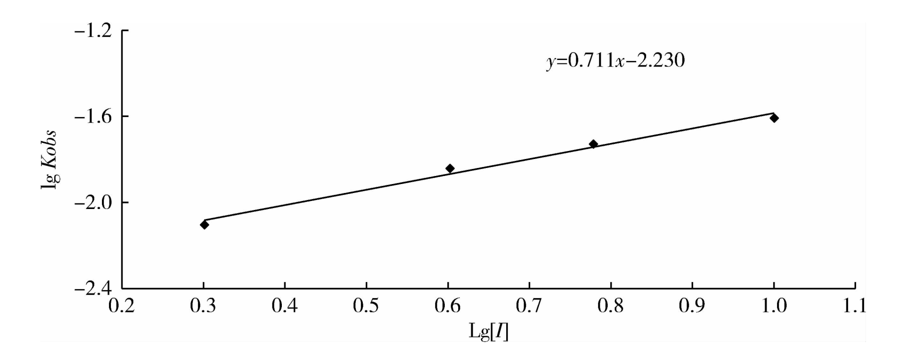


图 3 EDC 作用下棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性位点的 *k*1 和 *n*

Fig. 3 Determination of *k*1 and *n* of the active site of the soluble trehalse from the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* treated with EDC

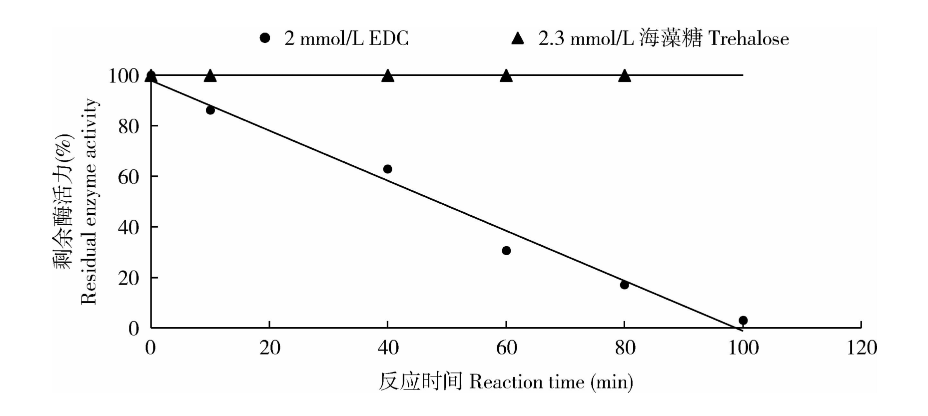


图 4 海藻糖对 EDC 化学修饰保护

Fig. 4 Protection of EDC modification by trehalose

2.2 PG 对棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性的影响

由图 5 可知,海藻糖酶活性明显受到 PG 修饰作用的影响,且随 PG 浓度升高以及反应时间延长而明显下降。当 PG 终浓度增加到 25 mmol/L 时,酶活力仅剩余 45.86%。这表明精氨酸残基可能参

与海藻糖酶活性中心的组成或维持海藻糖酶的活性构象。

由图 6 可知，PG 对海藻糖酶的修饰作用按一级反应进行，且其一级失活速度常数随 PG 浓度升高而升高，PG 浓度为 7.5，12.5，15 和 25 mmol/L 时，一级失活常数分别为 0.0024，0.0050，0.066 和 0.0098/min。

采用 Hollenberg 作图法，以 lg*Kobs* 对 log[*I*] 作图。如图 7 所示，其直线斜率为 1.79。这表明每个海藻糖酶分子结合 2 个 PG 分子后就导致酶活力的完全丧失，即每个海藻糖酶分子中仅有 2 个精氨酸残基是维持酶活性所必需的。

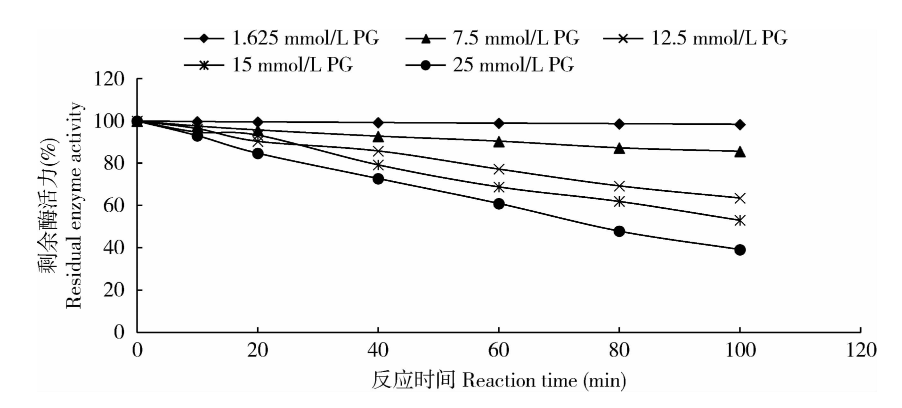


图 5　PG 对棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性的影响

Fig. 5　Effect of PG on the soluble trehalase activity in the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

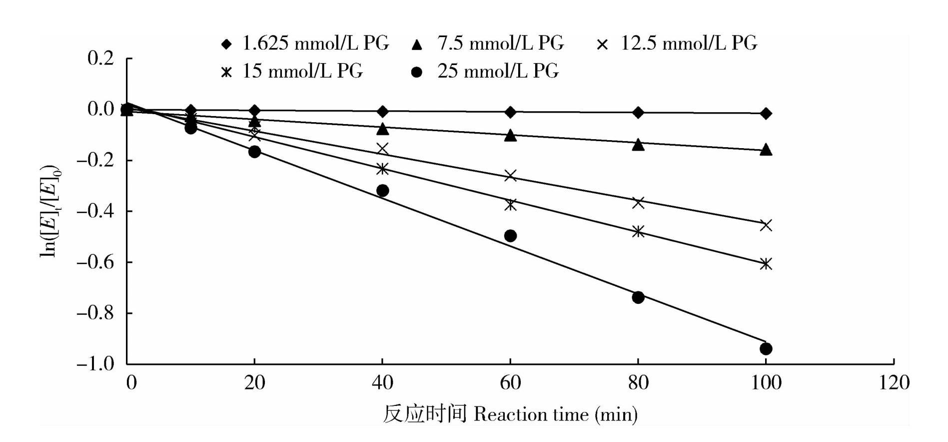


图 6　PG 对棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性位点的伪一级失活反应

Fig. 6　Pseudo-first-order plots for the inactivation of the soluble trehalse active site from the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* by PG

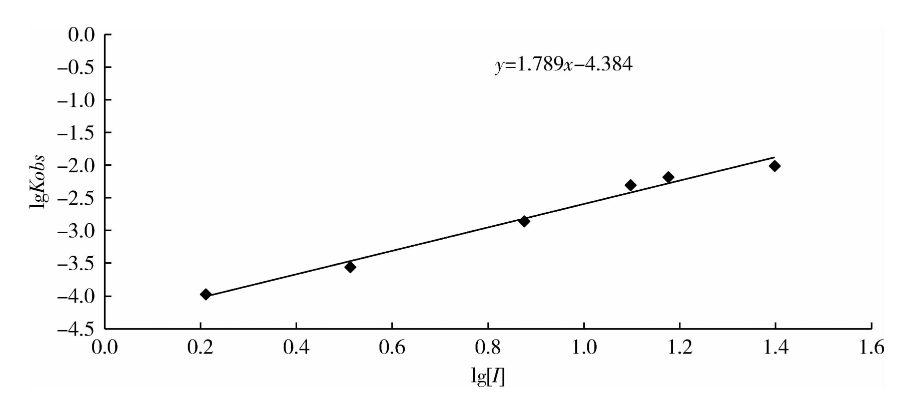


图 7　Hollenberg 作图法测 PG 作用下棉铃虫 5 龄幼虫中肠可溶性海藻糖酶活性位点的 $k1$ 和 n

Fig. 7　Hollenberg plots for the determination of $k1$ and n of the active site of the soluble trehalse from the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera* on reaction with PG

2.3 其他化学修饰剂对海藻糖酶的修饰

如表 2 所示，分别经 TNBS，DPC 和 TNM 等处理后，海藻糖酶的剩余活性均在 90% 以上，即 3 种化学修饰剂对海藻糖酶活性均无明显作用。这表明赖氨酸、组氨酸和酪氨酸等在海藻糖酶结构上与活性并无明显关系。

表 2 其他化学修饰剂对棉铃虫中肠可溶性海藻糖酶活性影响

Table 2 Effect of other chemical modifiers on the soluble trehalse activity in the midgut of the 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

修饰基团 Modified group	化学修饰剂 Chemical modifier	终浓度(mmol/L) Final concentration	反应时间(min) Reaction time	剩余酶活力(%) Residual enzyme activity
Lys	TNBS	40	80	>90
His	DPC	40	30	>90
Tyr	TNM	40	30	>90

3 讨论

化学修饰可以改变酶蛋白的分子结构，包括主链结构和侧链基团等(刘小林，2011)。其中，专一性的化学修饰剂与酶蛋白中的特定侧链基团结合，导致酶活性降低甚至完全失活，因此特定化学修饰剂作用后的酶活性变化可用于分析酶的活性中心及其必要基团的组成(王红扬等，2016)。前期研究结果表明，一些植物源化合物如栗精碱等是棉铃虫中肠可溶型海藻糖酶的有效竞争性抑制剂，可用于开发棉铃虫新型杀虫剂(于彩虹等，2016)。然而，由于缺乏棉铃虫可溶型海藻糖酶的活性结构信息，植物源候选化合物的抑制作用机制至今尚不明了。本研究通过化学修饰反应来分析海藻糖酶活性中心的结构特点，为进一步明确候选化合物的抑制机理及其用于新型海藻糖酶抑制剂的开发提供基础。

本研究分别采用专一性化学修饰剂如焦炭酸二乙酯、水溶性碳二亚胺、苯甲酰甲醛、四硝基甲烷和三硝基苯磺酸等作用于棉铃虫可溶性海藻糖酶的组氨酸咪唑基、谷氨酸和天冬氨酸羧基、精氨酸胍基、酪氨酸酚基和赖氨酸 ε-氨基等，以分析这些基因在保持海藻糖酶活性中的作用。结果表明，在 EDC 修饰作用下，海藻糖酶活性被严重抑制，说明羧酸基团可能位于海藻糖酶的活性中心部位，即海藻糖活性中心可能含有羧基氨基酸，如谷氨酸或天冬氨酸。在大肠杆菌 *Escherichia coli* 周质海藻糖酶中，通过 X 射线衍射法证明谷氨酸 Glu419 和天冬氨酸 Asp312 分别为碱性和酸性催化位点(Gibson *et al*., 2007)。在草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (Silva *et al*., 2010)、摇蚊 *Chironomus riparius* (Forcella *et al*., 2012)和黄粉虫 *Tenebrio molitor* (Gomez *et al*., 2013)等海藻糖酶中，谷氨酸和天冬氨酸也为推定的催化位点。对棉铃虫可溶性海藻糖酶的基因克隆结果表明，这两种氨基酸残基同样出现在棉铃虫海藻糖酶氨基酸序列的相应位置(Ma *et al*., 2015)，因此推测 Asp321 或 Glu519 为棉铃虫海藻糖酶的催化位点。仅通过化学修饰使酶活性降低无法确定催化位点，当酶失活程度与抑制剂浓度成比例关系且底物或抑制剂可以保护酶分子免受修饰剂作用的情况下，才可以确定此基团为酶活性中心基团。因此，本研究采用底物海藻糖对海藻糖酶进行修饰保护，发现酶活性不受影响。这进一步证明了谷氨酸或天冬氨酸为棉铃虫可溶性海藻糖酶活性中心的催化残基。

对精氨酸的化学修饰结果表明，精氨酸残基对维持海藻糖酶活性具有重要作用。这与对草地夜蛾的研究结果相类似，将草地夜蛾可溶性海藻糖酶进行定点突变可导致酶活性大幅度下降(Silva *et al*., 2010)。根据序列相似性推测精氨酸残基包含在 R168，R221 和 R286 当中(Gomez *et al*., 2013)，位于海藻糖酶的活性部位，与过渡态底物相结合，或起到稳定海藻糖酶构象的作用(武忠亮和刘纪宏，2013)。

对海藻糖酶修饰反应失活常数的测定表明，海藻糖酶分子中仅有 1 个羧酸基团和 2 个精氨酸残基为酶活性所必需。这与其他昆虫海藻糖酶的必需残基数量有所差异(Silva *et al*., 2010；Forcella *et al*., 2012；Gomez *et al*., 2013)，其原因有待于进一步研究。

参考文献(References)

Jie C, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang X, Jing C, Zhang D, Zhang W, 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound

trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*, 5(4): e10133.

Dill KA, Shortle D, 1991. Denatured states of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 60(1): 795–825.

Enoch HG, Strittmatter P, 1978. Role of tyrosyl and arginyl residues in rat liver microsomal stearylcoenzyme A desaturase. *Biochemistry*, 17(23): 4927–4932.

Forcella M, Mozzi A, Bigi A, Parenti P, Fusi P, 2012. Molecular cloning of soluble trehalase from *Chironomus riparius* larvae, its heterologous expression in *Escherichia coli* and bioinformatic analysis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 81(2): 77–89.

Gibson RP, Gloster TM, Roberts S, Warren RA, Storch GI, García A, Davies GJ, 2007. Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angew. Chem.*, 46(22): 4115–4119.

Gomez A, Cardoso C, Genta FA, Terra WR, Ferreira C, 2013. Active site characterization and molecular cloning of *Tenebrio molitor* midgut trehalase and comments on their insect homologs. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(8): 768–780.

Lee JH, Saito S, Mori H, Nishimoto M, Okuyama M, Kim D, Wongchawalit J, Kimura A, Chiba S, 2007. Molecular cloning of cDNA for trehalase from the European honeybee, *Apis mellifera* L., and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(9): 2256–2265.

Liu XL, 2011. Characters of polygalacturonase and its chemically modified enzyme. *Jiangsu J. Agric. Sci.*, 27(2): 415–419. [刘小林, 2011. 多聚半乳糖醛酸酶及其化学修饰酶的酶学性质. 江苏农业学报, 27(2): 415–419]

Ma L, Dai W, Li X, Zhang Y, Zhang C, 2015. Molecular cloning and expression analysis of soluble and membrane-bound trehalase genes in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Asia-Pacif. Entomol.*, 18(2): 187–195.

Silva MCP, Terra WR, Ferreira C, 2006. Absorption of toxic β-glucosides produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 143(3): 367–373.

Silva MCP, Terra WR, Ferreira C, 2010. The catalytic and other residues essential for the activity of the midgut trehalase from *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem Molec. Biol.*, 40(10): 733–741.

Tan Y, Xiao L, Yang S, Jing Z, Bai L, Xiao Y, 2014. Molecular characterization of soluble and membrane-bound trehalases in the cotton mirid bug, *Apolygus lucorum*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 86(2): 107–121.

Wang HY, Sun CY, Huang M, Tang YM, 2016. Chemical modification of functional groups of peroxidase from leaves of *Ipomoea aquatica* Forsk. *J. Food Sci. Biotechnol.*, 35(2): 192–196. [王红扬, 孙才云, 黄忙, 唐云明, 2016. 蕹菜叶过氧化物酶功能基团的化学修饰. 食品与生物技术学报, 35(2): 192–196]

Wang YF, Yakovlevsky K, Margolin AL, 1996. An efficient synthesis of chiral amino acid and peptide alkylamides via CLEC-subtilisin catalyzed coupling and *in situ* resolution. *Tetrah. Letters*, 37(30): 5317–5320.

Wu ZL, Liu JH, 2016. Chemical modification of alkaline phosphatase from *Oreochromis niloticus*. *Guangdong Agric. Sci.*, 40(3): 82–84. [武忠亮, 刘纪宏, 2013. 罗非鱼碱性磷酸酶的化学修饰. 广东农业科学, 40(3): 82–84]

Yang F, Chen S, Dai ZM, Chen DF, Duan RB, Wang HL, Jia SN, Yang WJ, 2013. Regulation of trehalase expression inhibits apoptosis in diapause cysts of *Artemia*. *Biochem. J.*, 456(2): 185–194.

Yu CH, Ai D, Liang XH, Wang ZB, Guo JJ, Jiang H, Lin RH, 2016. Inhibitory effects of castanospermine on soluble trehalase from the midgut tissues of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuiadae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(3): 301–308. [于彩虹, 艾东, 梁晓贺, 王振波, 郭建军, 姜辉, 林荣华, 2016. 栗精碱对棉铃虫中肠组织可溶型海藻糖酶的抑制效应. 昆虫学报, 59(3): 301–308]

Yu CH, Liang XH, Lu D, Wang XJ, Jiang H, Lin RH, 2011. Trehalase activity and carbohydrate content of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in response to several botanical compounds. *Acta Entomol. Sin.*, 54(1): 41–49. [于彩虹, 梁晓贺, 卢丹, 王晓军, 姜辉, 林荣华, 2011. 几种植物源化合物对棉铃虫海藻糖酶活性及相关碳水化合物含量的影响. 昆虫学报, 54(1): 41–49]

Zou Q, Wei P, Xu Q, Zheng HZ, Tang B, Wang SG, 2013. cDNA cloning and characterization of two trehalases from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidade). *Genet. Mol. Res.*, 12(2): 901–915.

（责任编辑：赵利辉）